

药物中半胱氨酸的流动注射荧光测定方法研究^{*}

曹秋娥, 李 菲

(云南大学 化学系, 云南 昆明 650091)

摘要:在近中性介质及聚乙烯醇(PVA)存在下,半胱氨酸能熄灭一个新的荧光试剂 5-(4-氯苯基)-8-苯磺酰氨基喹啉(CPBSQ)与 Cu(II)络合体系的荧光的反应.基于此现象,本文建立了一个测定半胱氨酸的流动注射荧光熄灭方法.结果表明,在 $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 327/368$ nm 处测定,方法的进样频率为 64 h^{-1} ,检测范围为 $0.05 \sim 5.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,检出下限为 $0.01 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,对 $4.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 半胱氨酸平行测定 11 次的相对标准偏差为 1.52%.大量存在的常见金属离子、蛋白质及很多不带巯基的氨基酸不干扰测定.应用此方法测定了某些注射液剂中半胱氨酸的含量,结果满意.

关键词:半胱氨酸;药物;荧光测定;流动注射分析

中图分类号:R 917 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-7971(2003)03-0266-03

半胱氨酸是生命体内一种重要的生理活性物质,它作为还原性谷胱甘肽的底物可以增加谷胱甘肽的生成量,从而保护细胞膜的稳定性,减轻心肌细胞在缺血再灌注中的损伤^[1].此外,半胱氨酸还有刺激前 T 淋巴细胞分化为成熟的淋巴细胞的作用及增加人体对某些毒素的抵抗力^[2].因此,对半胱氨酸的研究包括定量分析引起了人们广泛的兴趣.目前,半胱氨酸的定量测定一般是利用其还原性及其与某些有机试剂发生反应后,用电化学^[3]、分光光度法^[4,5]、化学发光法^[6]、催化动力学方法^[7]及荧光方法^[8]进行测定,这些方法或操作复杂、或灵敏度不高或选择性较差.本文利用半胱氨酸能熄灭一个新的荧光试剂 5-(4-氯苯基)-8-苯磺酰氨基喹啉(CPBSQ)与 Cu(II)络合体系的荧光这一特性,建立了一个简单、快速、灵敏和选择性的测定半胱氨酸的流动注射荧光方法.用这一方法测定了药物中半胱氨酸的含量,结果满意.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 日立 M-850 荧光光度计带一个 $18 \mu\text{L}$ 的石英流通比色池;Tacator 5020 型流动注射分析仪带一个 5101 型恒温槽(瑞典);所有的

泵管为聚乙烯管(0.5 mm),其它管子为聚四氟乙烯管;pHs-2 型 pH 计(上海).

CPBSQ 参照文献合成^[9], $1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 的 CPBSQ 溶液由 95%乙醇配制;Cu(II)溶液按标准方法配制; $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的半胱氨酸(上海生化制品研究所)储备液含 0.2 mol L^{-1} HCl,工作溶液每天用水稀释得到;缓冲溶液(pH7.5)由 0.1 mol L^{-1} 的 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 和 0.1 mol L^{-1} HCl 配制; 1.0% 聚乙烯醇(PVA)水溶液.

1.2 实验方法 流动注射体系(FIA)的流路如图 1 所示,其基本条件见表 1.当恒温槽的温度达到 90°C 后,载流 C 和试剂 R1 及 R2 被泵入流路中,样品溶液被泵入样品管中.在记录仪上得到稳定的基线后,把样品注入流路中,在 $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 327/368$ nm 处记录荧光熄灭差值.

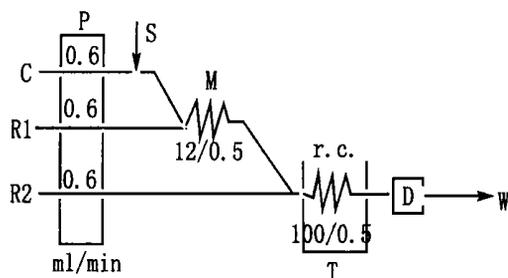
2 结果与讨论

2.1 荧光光谱及反应机理 图中曲线从上至下分别为 CPBSQ - Cu(II), CPBSQ - Cu(II) - 半胱氨酸($C_{\text{cys}} = 2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), CPBSQ - Cu(II) - 半胱氨酸($C_{\text{cys}} = 20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)及 CPBSQ 的荧光光谱.

* 收稿日期:2003-03-27

基金项目:云南省教育厅自然科学基金资助项目(0012084).

作者简介:曹秋娥(1967-),女,湖南人,博士,教授,主要从事分离科学及药物分析研究工作.



C:载流;R1和R2体积比为1:1的CPBSQ和PVA混合液及pH 7.5的硼砂缓冲溶液;P:蠕动泵;S:样品;M:混合管;r.c.:反应管;T:恒温槽;D:检测器(荧光光度计);W:废液缸

图1 测定半胱氨酸的FIA流路图

Fig. 1 Schematic diagram of the flow injection system for the determination of cysteines

表1 FIA体系参数表

Tab. 1 The parameters of the flow injection system

参数名称	参数值
载流 C 的组成及流速	1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Cu (II), 0.6 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$
试剂 R1 的组成及流速	1.1 CPBSQ ($1.2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) 和 PVA (1.0 %); 0.6 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$
试剂 R2 的组成及流速	pH 7.5 缓冲溶液; 0.6 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$
进样体积	120 μL
混合管长度	12 cm
反应管长度	100 cm
恒温槽温度	90
荧光测定波长	$\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 327 / 368 \text{ nm}$

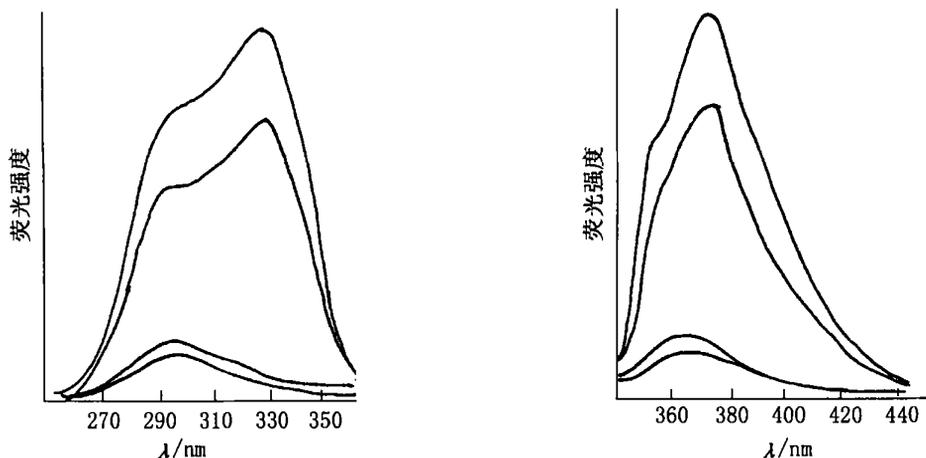


图2 荧光激发(左)和发射(右)光谱

Fig. 2 Fluorescence excitation (left) and emission (right) spectra

CPBSQ, CPBSQ - Cu (II) 及 CPBSQ - Cu (II) - 半胱氨酸 3 个体系在 PVA 存在下的荧光光谱如图 2 所示。由图 2 可见,半胱氨酸的加入只是使 CPBSQ - Cu (II) 体系的荧光强度降低,但并不改变其光谱形状;当半胱氨酸的浓度足够大时,CPBSQ - Cu (II) - 半胱氨酸的荧光光谱几乎与 CPBSQ 的荧光光谱重叠,说明半胱氨酸与 CPBSQ - Cu (II) 之间没有产生荧光络合物。在 Cu (II) 与 CPBSQ 反应之前,先加入还原剂(如 NaBH₄)将 Cu (II) 还原为 Cu (I) 后再与 CPBSQ 反应,得到的产物没有荧光,说明 CPBSQ - Cu (I) 为非荧光络合物,这可能是 Cu (I) 的顺磁性造成的。考虑到半胱氨酸能使 Cu (II) - 新亚铜灵体系中的 Cu (II) 还原到 Cu (I)^[4],因此,我们推测在半胱氨酸 - CPBSQ - Cu

(II) 体系中,半胱氨酸将 Cu (II) 还原到了 Cu (I),从而使体系的荧光熄灭。体系的最大荧光激发和发射波长分别为 327 nm 及 368 nm。

2.2 FIA 条件的选择 体系的灵敏度随反应管的长度及一定范围内样品注入体积的增加而增加,但不随混合管长度的改变而改变。为了兼顾进样频率和灵敏度,最终选择混合管和反应管的长度分别为 12 cm 和 100 cm,样品注入体积为 120 μL ,体系总流速为 1.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在这些条件下,进样频率 64 h^{-1} 。

2.3 酸度的影响 在强酸或强碱性条件下,CPBSQ 与 Cu (II) 之间难以发生反应,它们之间反应的最佳酸度范围为 pH 7.0 ~ 8.0。在这一 pH 范围内,体系的荧光熄灭程度最大且保持稳定。实验选用

pH 7.5.

2.4 试剂质量浓度的影响 当 Cu(II) 的浓度固定在 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,体系的灵敏度先随 CPBSQ 浓度的增加而增加,然后稳定在其质量浓度位于 $(3.5 \sim 6.2) \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 间,最后又下降.当 CPBSQ 的浓度选定为 $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,体系的灵敏度及检测范围在一定范围内随 Cu(II) 的浓度的增加而增加,最佳的 Cu(II) 质量浓度范围为 $0.75 \sim 1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. 实验选用 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

2.5 表面活性剂及其用量的选择 无表面活性剂存在时,络合物的溶解性极差,非离子及阳离子表面活性剂如 OP, PVA, Triton X-100, Tween-80, 阿拉伯胶, CTMAB 的存在均能使体系的灵敏度及溶解性得到改善. 其中以 PVA 效果最好. PVA 的体积分数在 $0.25\% \sim 1.0\%$ 之间,体系的荧光熄灭程度最大且保持稳定,实验选用 0.5% .

2.6 加热温度及时间的影响 Cu(II) 与 CPBSQ 在常温下不反应. 随温度的升高,其荧光强度迅速增加,在 80°C 以上时达到稳定. 加热时间在 1 min 以内,对体系的灵敏度影响不大. 因此,本实验选用 90°C 加热下的连续流动体系.

2.7 线性范围、检出限及精密度 在试验条件下,半胱氨酸的质量浓度在 $0.05 \sim 5.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与荧光熄灭强度成良好的线性关系,其线性回归方程为 $F = 0.158 + 2.731 C (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) (r = 0.$

$9991)$. 方法的检出限按 3 方法算得为 $0.01 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. 对 $4.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 半胱氨酸测定的相对标准偏差为 $1.52\% (n = 11)$.

2.8 共存物的影响 实验了许多金属离子、蛋白、糖及氨基酸对 $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 半胱氨酸测定的影响. 结果表明当允许误差 $\pm 5\%$, 下列物质 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 不干扰测定: 人血清白蛋白, 牛血清白蛋白, 鸡蛋白, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , NH_4^+ , PO_4^{3-} (> 1000); 甲硫氨酸, 丙氨酸, 苏氨酸, 色氨酸, 脯氨酸 (200); 天冬氨酸, 亮氨酸, 酪氨酸, 缬氨酸, 胱氨酸, SeO_3^{2-} , AsO_4^{3-} (100); 苯丙氨酸, 组氨酸, 尿素, Cd^{2+} , Al^{3+} , Mn^{2+} (50) 甘氨酸, Zn^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} (30); 葡萄糖, 维生素 C, Fe^{3+} , Hg^{2+} (20). 但等量的谷胱甘肽, 乙酰半胱氨酸, S^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 干扰测定.

3 分析应用

利用此方法及文献推荐的方法^[4]对左旋多巴注射液、肝宁注射液及注射用 L-半胱氨酸盐酸盐 (L-Cys·HCl) 中半胱氨酸的含量分别进行了测定,结果对照见表 2. 可见用本方法测得的结果与用文献方法测得的结果是一致的,另外,由回收率 (每次标准加入半胱氨酸量为 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 结果也可看出用本方法测得的结果是可靠的.

表 2 注射液中半胱氨酸的分析结果对照

Tab. 2 Analysis of cysteine in the injections

注射液	厂家提供结果/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	本法结果/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$, $n = 5$	相对标准偏差/ $\%$	回收率/ $\%$
左旋多巴	0.48	0.46	1.42	102
辅酶 A	1.00	0.98	1.98	96
L-Cys·HCl	10.0	9.87	1.67	103

左旋多巴注射液为上海第一生化药业公司产品,注射用辅酶 A 及注射用 L-Cys(HCl) 为上海禾丰制药有限公司产品

参考文献:

- [1] 李爱玲, 高兰兴. 氨基酸对心血管功能的影响[J]. 氨基酸和生物资源, 1998, 20(2): 45—46.
- [2] 徐琪寿. 氨基酸药理学研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 1996, 18(1): 30—32.
- [3] 王国顺, 彭国治, 沈报恩, 等. 碳糊电极测定痕量半胱氨酸[J]. 分析化学, 1996, 24(11): 136—138.
- [4] TÜTEM E, APAK R. Simultaneous spectrophotometric

determination of cystine and cysteine in amino acid mixtures using copper-neocuproin reagent [J]. Anal Chim Acta, 1991, 255: 121—126.

- [5] EID M A. Spectrophotometric determination of cysteine and N-acetylcysteine in pharmaceutical preparation [J]. Mikrochim Acta, 1998, 129: 91—95.
- [6] 李杯娜, 慈云祥. 用流动注射法研究巯基化合物 - 铈(IV) - 氢化可的松的化学发光反应 [J]. 分析化学, 1997, 25(6): 679—681.

(下转第 276 页)

- istry[J]. *Annu Rev Earth Planet Sci*, 2001, 29:17—45.
- [10] HOFFMANN A A. *Extreme environmental change and evolution*[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.
- [11] DOEBELL M. *Speciation along environmental gradients*[J]. *Nature*, 2003, 421:259—264.
- [12] PIMM S L. *The future of biodiversity*[J]. *Science*, 1995, 269:347—350.

Investigation of global changes and promising opportunity in development of ecological sciences in Yunnan

DUAN Chang-qun

(School of Life Science of Yunnan University and National Key Laboratory Candidate for Bio-resource conservation and Utilization, Kunming 650091, China)

Abstract: Progress in global change ecology was reviewed, and globalized environmental pollution and its impact on evolutionary fate of living things were emphasized in this paper. The exclusive property of geological, geographic, climate and biological status in Yunnan were analysed to demonstrate the important role played in development of ecology in Yunnan. It is concluded Yunnan will have a promising future in investigation of global change.

Key words: global changes; globalised environmental pollution; biodiversity; Yunnan

* * * * *

(上接第 268 页)

- [7] LUNAR M L, RUBIO S, Pérez-Bendito D, et al. Hexadecylpyridinium chloride micelles for the simultaneous kinetic determination of cysteine and cystine by their induction of the iodine-azide reaction[J]. *Anal Chem Acta*, 1997, 337:341—346.
- [8] LI Y Z, LIU H F, CHANG W B, et al. Selective determination of cystine based on its fluorogenic reaction with triethylamine chloroacetonitrile[J]. *Anal Lett*, 1998, 31:1499—1506.
- [9] CAO Q E, ZHAO Y K, WU S Q, et al. Study on the mechanism and applications of the fluorescent reagents among cobalt (II), H₂O₂ and two new derivatives of 8-sulfonamidoquinoline[J]. *Talanta*, 2000, 51:615—620.

Study on the flow injection method for the fluorescence determination of L-cysteine in the medicine injection

CAO Qiue, LI Fei

(Department of Chemistry, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: A flow injection method for the fluorescence determination of L-cysteine in the medicine injection has been developed based on the fluorescence quenches of the complex system between a new fluorescence reagent: 5-(4-chlorophenylazo)-8-benzenesulfonamidoquinoline (CPBSQ) and Cu(II) cysteine. The determination is carried out at $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 327/368$ nm. The sample frequency of the method is 64 h⁻¹ with a linear range of 0.05—5.5 μg·mL⁻¹ and a detection limit of 0.01 μg·mL⁻¹. The relative standard deviation (RSD) for the determination of 11 samples of 4.0 mg L⁻¹ cysteine is 1.52%. A lot of metal ions, protein and amino acid without -SH group do not interfere the determination. The proposed method has been applied to the determination of cysteine in the medicine injection with satisfactory results.

Key words: cysteine; medicine; spectrofluorimetry; Flow injection analysis